

셀로비오스의 미백화장품 소재 가능성 평가를 위한 멜라닌 세포에서 자가포식 및 멜라닌 생성 효능 연구

차 병 선^{*,†} · 이 석 주^{**,†} · Sofia Brito^{**,†} · 정 소 영^{***,†} · 이 소 민^{****,†} · Lei Lei^{****} ·
이 상 훈^{****} · Zubaidah Al-Khafaji^{***} · 빈 범 호^{*****,††} · 곽 병 문^{*****,††} · 허 효 진^{**,††}

*아주대학교 생명과학과, 박사과정 학생

**아주대학교 응용생명공학부, 박사과정 학생

***아주대학교 응용생명공학부, 석사과정 학생

****아주대학교 생명과학과, 석사과정 학생

*****아주대학교 생명과학과, 교수

*****아주대학교 생명과학과, 박사 후 연구원

(2022년 10월 24일 접수, 2022년 12월 13일 수정, 2022년 12월 27일 채택)

Evaluation of the Potential of Cellobiose as a Material for Whitening Cosmetics based on Autophagy and Melanin Production Efficacy in Melanocytes

Byungsun Cha^{1,†}, Seok ju Lee^{2,†}, Sofia Brito^{2,†}, So Young Jung^{2,†}, So Min Lee^{1,†}, Lei Lei¹,
Sang Hun Lee¹, Zubaidah Al-Khafaji², Bum-Ho Bin^{1,2,††}, Byeong-Mun Kwak^{1,††}, and Hyojin Heo^{2,††}

¹Department of Biology, Ajou University, 206, World cup-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si,
Gyeonggi-do 16499, Republic of Korea

²Department of Applied Biotechnology, Ajou University

(Received October 24, 2022; Revised December 13, 2022; Accepted December 27, 2022)

요약: 셀로비오스(cellobiose)는 식물 등에 널리 분포하는 셀룰로오스의 분해 과정에서 생성되는 이당류이다. 환원당인 셀로비오스는 2 개의 β -1,4 결합으로 결합한 구조를 가지며, 식물 등에 존재하는 천연물로서, 건강 식품이나 식품의 감미료, 화장품 원료, 의약품 원료로서 활용되어지고 있다. 본 연구에서는 다양하게 유용될 셀로비오스를 기능성 화장품인 미백 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자, 자가포식 활성화 및 멜라닌 생성 저해 효능을 검토하였다. 인간 유래 멜라닌 생성 세포로 알려진 MNT-1 세포에서 셀로비오스의 농도에 따른 독성 실험을 진행한 결과 20 mg/mL 이하에서 세포독성이 없음을 확인하였고, 공초점 현미경을 통해 셀로비오스 처리에 따른 자가포식 표지자인 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) puncta의 증가가 확인되었다. 또한 LC3의 형태가 LC3-I에서 LC3-II로 변환됨을 확인하였으며, 농도와 시간에 따라 LC3-II 양이 증가하는 것을 확인하였다. 셀로비오스를 동일 세포에서 20 mg/mL 농도로 7 일간 처리하여 멜라닌 생성량을 분석한 결과, 50% 이상 멜라닌 생성 감소를 확인하였다. 추가적으로, 멜라닌 생성 관련 단백질 TYR 및 TYRP1의 발현량을 western blot법을 이용하여 분석한 결과, 농도의존적으로 발현이 저해되어 멜라닌 생성이 감소함을 확인하였다. 이러한 연구 내용을 기반으로 토대로 셀로비오스를 함유한 화장품 크림제형을 확보하여 4 주 동안 제형의 변화를 확인 해본 결과 성상이 고온에서 액체형태로 변화하였지만 pH는 변화하지 않았음을 확인하였다. 결론적으로,

† 주 저자 (e-mail: sunlits@ajou.ac.kr)
call: 031-219-2618

†† 교신저자 (e-mail: gjgywls596@ajou.ac.kr)
call: 031-219-2618

자가포식 활성화 및 멜라닌 생성 억제 과정에 셀로비오스가 관여함을 확인하였으며, 이를 통해 미백 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제안하고자 한다.

Abstract: Cellobiose is a disaccharide constituted by two glucose units joined by a β -(1,4') glycosidic bond that is produced by the decomposition of cellulose. This product exists naturally in plants and has been utilized in different industries as a food sweetener, and as a cosmetic and pharmaceutical material. In this study, the potential of cellobiose as a whitening cosmetic product was evaluated by analyzing autophagy induction and the inhibition of melanin production. A cytotoxicity test conducted in the human melanin-producing cell line MNT-1 with increasing concentrations of cellobiose revealed that this compound did not cause cytotoxicity at 20 mg/mL or less. Based on this, autophagy was firstly evaluated by immunostaining with the autophagy marker microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) after treatment with 20 mg/mL of cellobiose. The subsequent confocal microscopy analysis revealed an increase in LC3 puncta, indicating induction of autophagy. In addition, autophagy was further confirmed by western blot analysis, which demonstrated that cellobiose converted LC3-I to LC3-II in a concentration- and time-dependent manners. An analysis of melanin contents after cellobiose treatment at a concentration of 20 mg/mL during 7 days revealed that melanin production was reduced by more than 50%. Additionally, the expression levels of melanogenesis-related proteins TYR and TYRP1 were markedly decreased after cellobiose treatment. Based on these studies, a cosmetic cream formulation containing cellobiose was prepared and the change in formulation was tested for 4 weeks, and it was confirmed that the appearance changed to liquid form at high temperature, but the pH did not change. In conclusion, the present research demonstrated that cellobiose activates autophagy and inhibits melanin production, and showed the potential of this product as a material for whitening cosmetics.

Keywords: cellobiose, natural product, autophagy, whitening, melanin

1. 서 론

셀로비오스(cellobiose)는 포도당 구성요소를 갖고 있고, 셀룰로스(cellulose)와 유사한 구조를 가지며, 셀룰로스와 면, 황마 또는 종이와 같은 풍부한 물질의 효소 가수분해에 의해 얻을 수 있다. 셀로비오스는 꽃 피는 식물, 칩엽수 및 기타 겉씨식물에서 발견되는 식물 대사산물이며, 식물성 식품을 섭취한 척추동물에서 발견할 수 있다. 포유류는 소장에서 광범위하게 대사하는 내인성 베타 글리코시다아제를 가지고 있으며, 사람은 셀로비오스가 함유된 식품으로 섭취가 가능하지만, 쉽게 소화하지 못한다. 따라서 셀로비오스는 크론병 및 흡수장애 증후군의 지표 탄수화물로 사용될 수 있다. 이를 바탕으로 셀로비오스는 식품, 제약 등 다양한 분야에서 활용되고 있다[1-3].

자가포식(autophagy)은 세포 내 에너지 수준을 유지함으로써 세포 생존성을 향상시키는 효과를 내기 위해, 필요 없거나 또는 이상 기능을 나타내는 세포내 소기관의 분해에 관여하는 기본적인 작용기작을 말한다[4]. 자가포식 활성화는 젊은 사람은 세포 내에서 활발하게 일어나지만, 노화가 진행되면서 세포 내 노후 또는 손상된 지질, 미토콘드리아가 적절한 시기에 제거하지 못해 노화가 촉진될 수 있다[5-8]. 따라서 다양한 연구를 통해 자가포식의 활성화

시킴으로써, 노화가 진행됨에 따라 세포, 조직 및 개체의 노화를 억제함으로써, 각종 질환의 개선에 효능이 있음을 보고 되어지고 있다[9-11].

자가포식소체(autophagosome)의 막과 안정적인 결합을 형성하는 것으로 알려진 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)은 대표적인 자가포식 표지자로 활용되고 있다. 자가포식은 크게 3단계로 진행되어지며, 1 단계에서는 자가포식이 유도되며, 2 단계에서는 자가포식소체가 형성되는 단계로, LC3-I이 절단되고 지질화되어 LC3-II로 전환되게 되고, 자식포식소체 막에 존재하게 된다. 3 단계는 상기 자가포식소체와 라이소솜(lysosome)의 융합으로, 상기 세포내 소기관이 분해된다[12-14].

최근 연구에서는 자가포식의 활성화는 인종에 따른 피부색을 조절하는 데에 중요하다고 보고되어 있으며, 자가포식 활성화를 통해 멜라노솜 합성 단백질인 tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1)을 분해를 유도할 수 있는 것으로 보고되었다[15-19].

본 연구에서는 자가포식 표지자인 LC3의 발현 비율을 증대시키고, 셀로비오스의 자가포식 활성화 조성물로서 가능성을 확인할 뿐 아니라 멜라닌 생성 분해 억제함을 보여 주며, 셀로비오스의 미백 화장품 소재로서의 피부 색소 침착의 예방, 개선에 적용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 시약

본 연구에서 사용된 세포주인 malignant melanoma cell line (MNT-1)은 미국국립보건원(USA)의 Dr. Vincent J. Hearing로부터 분양받았다. 세포 배양에는 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), penicillin/streptomycin (Welgene, Korea), N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES, Gibco, USA), DMEM/high glucose (DMEM, Lonza, Switzerland)와 셀로비오스(cellobiose, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였으며, 세포 독성 평가 실험에서는 cell proliferation kit I (#11465007001;Basel, Switzerland)을 사용한 MIT 분석으로 평가하였다. 형광염색에 LC3B (D11) XP[®] rabbit mAb (LC3, Cell Signaling, USA), formaldehyde (Biosolution, Korea), triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA), phosphate- buffered saline (PBS, Gibco, USA), DAPI (Sigma-Aldrich, USA)와 Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technology, USA)를 사용하였다. 멜라닌 함량 측정 실험에서는 0.1 M tris-HCl (pH 7.2), Nonidet P-40 (NP-40), sodium lauryl sulfate (SDS), protease inhibitor cocktail, 1 N sodium hydroxide는 Sigma-Aldrich (USA)를 사용하였다. 단백질 발현 효과 측정에 IGEPAL[®] CA-630와 polyvinylidene fluoride (PVDF) 1 차 항체인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein 1 (TYRP1) Sigma-Aldrich (USA)를 구입하였다. 2 차 항체인 goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP, goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP는 (Gendepot, USA)를 사용하였다.

2.2. 세포배양

실험에는 인간 흑색종 세포로 알려진 MNT-1 세포를 사용하였으며, 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 20 mM HEPES를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다[16].

2.3. 세포 생존능(Cell Viability) 측정

시료의 세포 독성을 평가하기 위해 MIT assay 실험을 수행하였다. 실험에서 사용한 MNT-1 세포는 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 20 mM HEPES를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 독성은 MIT assay를 이용하여 측정하였다[17]. MNT-1 세포를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 96 well plate에 분

주한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. 세포 배양에 사용된 배지를 제거하고 cellobiose을 10, 20, 40 g/L 농도로 배지에 희석하여 각 well 내 첨가하여 24 h 배양하였다. 대조군에는 cellobiose를 첨가하지 않은 배지를 사용하였다. 그 후에 cell proliferation kit 제조시서 따라 분석하였다. 흡광도는 분광 광도계(SpectraMAX 190, Molecular Devices, USA)로 540 nm 파장에서 측정하였다. 이후 각각의 세포 독성은 세포 생존율로 표시하였다.

2.4. 면역형광염색법(Immunofluorescence)

MNT-1 세포를 1 × 10⁵ cells/dish 농도로 Lab-tek chamber slide (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)에 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. 세포 배양에 사용된 배지를 제거하고 cellobiose 혹은 glucose을 20 g/L 농도로 DMEM 배지에 희석하여 각 dish 내 분주하고 72 h 배양하였다. 대조군에는 cellobiose 및 glucose을 첨가하지 않은 DMEM 배지를 첨가한 후 다시 72 h 동안 배양하였다.

이후 형광 현미경 관찰을 위해 4% formaldehyde로 4 °C에서 24 h 동안 세포를 고정하였다. 고정된 세포에 염색을 위해 triton-100을 PBS에 1%로 희석하여 4 °C에서 5 min 배양한 후 LC3 antibody를 1 : 200 비율로 PBS에 희석하여 24 h 동안 세포에 부착시켰다. 이후 형광 접합 2 차 항체 alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG로 4 °C에서 1 : 400 비율로 1 h 동안 2 차 반응시킨 후 DAPI로 세포의 핵을 염색하였다. 염색된 세포는 공초점 현미경(confocal laser-scanning microscope, LSM 700, Germany)으로 관찰하였다.

2.5. Western Blot을 통한 단백질의 발현 측정

멜라닌 생성에 관여하는 단백질인 TYR, TYRP1의 발현량을 알아보기 위해 MNT-1 세포를 2 × 10⁴ cells/well 농도로 60 mm culture dish에 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24 h 배양하였다. 세포 배양에 사용된 배지를 제거하고 cellobiose을 20 g/L 농도로 DMEM 배지에 희석하여 각 well 내 첨가하였다. 대조군에는 cellobiose를 첨가하지 않은 DMEM 배지를 첨가한 후 다시 4 h 동안 배양하였다. 이후 세포를 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M sodium chloride, 0.01 M magnesium chloride solution와 protease inhibitor cocktail이 포함된 용액에서 1% IGEPAL[®] CA-630으로 용해하였다. 이후 4 °C 15,000 rpm으로 15 min 간 원심분리하여 상층액을 획득한 후 BCA assay를 이용하여 정량하였다. 20 μL의 단백질을 SDS-PAGE 상에서 전기영동

하여 크기 별로 분리한 후 단백질은 PVDF에 옮겨 Blocking buffer (1% BSA in TBS)을 제조하여 실온에서 1 h blocking 하였다. 이후 1 차 항체를 1 : 4,000 농도로 희석하여 4 °C 에서 overnight 후, 다시 10 min 간격으로 tris-buffered and tween 20 (TBS-T)로 3 회 세척하였다. 2 차 항체는 1 : 10,000 농도로 희석하여 실온 1 h 반응한 후 3 회 세척하여 발광시약 키트(Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 사용하여 밴드를 검출하고 Fusion Solo S (Koreabimics, Korea) 기기로 이미지를 획득하였다.

2.6. 멜라닌 감소 측정

시료의 멜라닌 함량을 측정하기 위해 melanin assay 실험을 수행하였다. 실험에서 사용한 MNT-1 세포는 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 20 mM HEPES을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 5×10^5 cells/well 농도로 6 well

plate에 분주한 후 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 7 일간 처리 후, 48 h 간격으로 배지를 교체하였다. 멜라닌 함량은 RIPA 완충액 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2), 1% NP-40, 1 mg/mL SDS, 0.1% protease inhibitor cocktail로 처리하여 용해 후 혼합하여 세포벽을 와해시켰다. 이후 4 °C 15,000 rpm으로 15 min 간 원심분리하여 상층액은 단백질을 측정하였고, 침전물은 멜라닌 함량을 측정하였다. 단백질량은 BCA assay를 이용하여 정량하였고, 침전된 멜라닌은 1 N sodium hydroxide에 넣어 100 °C에서 1 h 가열하였다. 이후 96 well plate에 침전된 멜라닌 용액을 well 당 90 µL 첨가하고, 분광 광도계로 450 nm 파장에서 측정하였다[17-18].

2.7. Cellobiose 함유 화장품의 제조 및 안정도 검증

Cellobiose의 화장품 소재로서의 적용을 검토하기 위해 피부 개선에 도움을 줄 수 있는 보습 크림을 제조하였다. Cellobiose이 2% 함유된 크림은 Table 1에 표기한 조성대로 제조하였다.

Table 1. Moisturizing Cream Containing Cellobiose

Ingredients	Phase	Contents (%)
Water		39.15
Glycerin		7.00
Butylene glycol		3.00
Hydroxy acetophenone	A	0.60
Glycine betaine		0.50
Biosaccharide gum-1		1.00
Allantoin		0.10
Sodium hyaluronate	B	1.00
Carbomer 940 (2.0% sol)		20.00
Niacinamide		2.00
Adenosine	C	0.05
Cellobiose		2
Glyceryl stearate / PEG-100 stearate		1.50
Sorbitan stearate		0.10
Stearic acid		1.00
Cetearyl alcohol		1.00
Dimethicone/Vinyl dimethicone crosspolymer		2.00
Ethylhexylglycerin	D	0.50
<i>Lavandula angustifolia</i> (lavender) oil		3.00
<i>Aniba rosodora</i> (rosewood) wood oil		1.50
<i>Pelargonium graveolens</i> oil		1.50
<i>Limnanthes alba</i> (meadowfoam) seed oil		6.00
<i>Rosa damascena</i> (rose) flower oil		1.50
Dimethicone		4.00

2.8. 통계처리

모든 실험에 대한 분석값은 3 회 반복 실험을 통하여 평균값과 표준 편차(mean ± SD)로 나타내었다. 통계적으로 유의한 차이는 student's *t*-test 방법을 사용하여 $p < 0.05$ 의 신뢰수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Cellobiose 농도에 따른 세포 생존능(Cell Viability) 측정과 면역형광 자가포식 변화 관찰

Cellobiose의 농도에 따른 세포 독성을 확인하기 위해 MTT assay 실험을 통하여 농도에 따른 세포 생존율을 검토하였다. Cellobiose은 10, 20, 40 mg/mL 농도로 처리하여 24 h 배양하였다. 10, 20 mg/mL 농도 적용 시 대조군과 비교하여 세포 생존률이 변화가 없었으며, 40 mg/mL 농도 조건에서는 세포 생존율이 감소함을 보여주었다. 따라서 후속 실험들은 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 20 mg/mL를 최대 농도로 설정하여 진행하였다. 자가포식의 활성화는 항상성을 유지할 뿐 아니라 면역세포와 세포, 조직 및 개체의 노화를 억제하고 노화로 인해 야기되는 질환의 치료에 도움을 준다. 따라서 cellobiose 처리에 의해 자가 포식 소체 형성이 촉진되는지 확인하기 위해 자가 포식 소체 마커로 알려진 LC3의 발현량을 확인하였다[9]. 무처

리균과 글루코오스를 처리군을 대조군으로 하였으며, 글루코오스는 cellobiose과 동일한 양을 처리하였다. 실험 결과 같은 당류인 글루코오스보다 cellobiose 처리군에서 자가포식 활성화로 인해 자가 포식 소체가 증가한 것을 확인하였다(Figure 1).

3.2. Cellobiose 농도와 시간별 자가포식 변화 관찰

Cellobiose 처리에 의해 자가포식소체 형성이 촉진되는지 확인하기 위해 자가포식소체 표지자로 알려진 LC3의 발현량을 비교하여 확인하였다. 또한 cellobiose의 농도를 세포 독성이 없는 20 mg/mL로 고정시키고 cellobiose 을

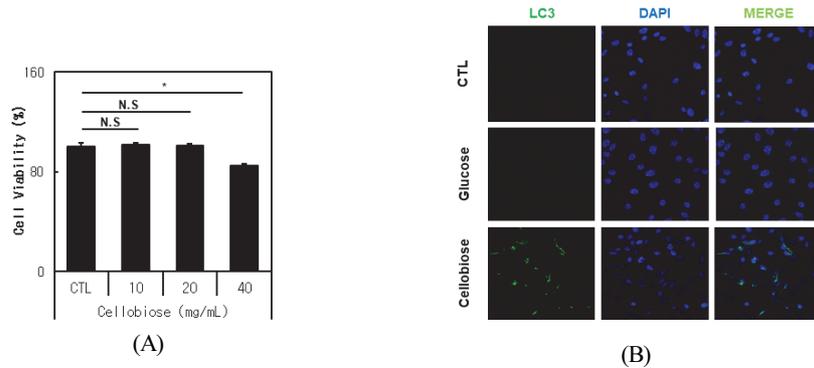


Figure 1. Effect of cellobiose treatment in cell viability and autophagosome formation in MNT-1 cells. (A) Cell viability of MNT-1 cells after treatment with increasing concentrations of cellobiose. (B) LC3 punta observed by confocal microscopy after treatment of MNT-1 cells with 20 mg/mL of glucose or cellobiose and immunostaining with LC3 antibody. Nuclei were stained with DAPI. The results are presented as the mean \pm SD of the experiment (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, compared to control.

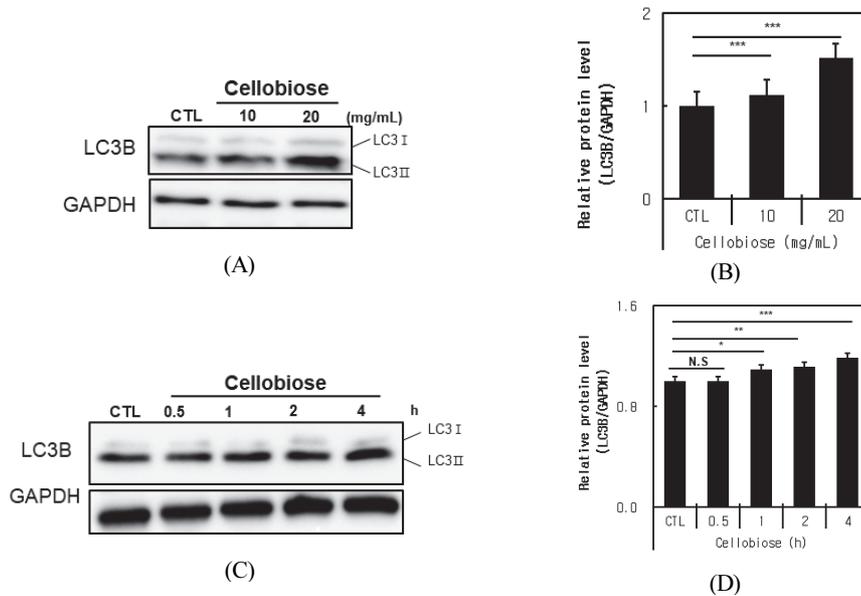


Figure 2. Cellobiose treatment led to increased autophagy in MNT-1 cells. (A) Results of the protein expression levels of LC3-I and LC3-II in MNT-1 cells after treatment with increasing cellobiose concentrations. (B) Comparison of LC3-I and LC3-II protein expression levels relative to Figure 2A after quantification with Image J software. (C) Results of the protein expression levels of LC3-I and LC3-II in MNT-1 cells overtime after treatment with 20 mg/mL of cellobiose. (D) Comparison of LC3-I and LC3-II protein expression levels relative to Figure 2C after quantification with Image J software. CTL, also known as control, was not treated with cellobiose. The results are presented as the mean \pm SD of the experiment (N = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005, compared to control.

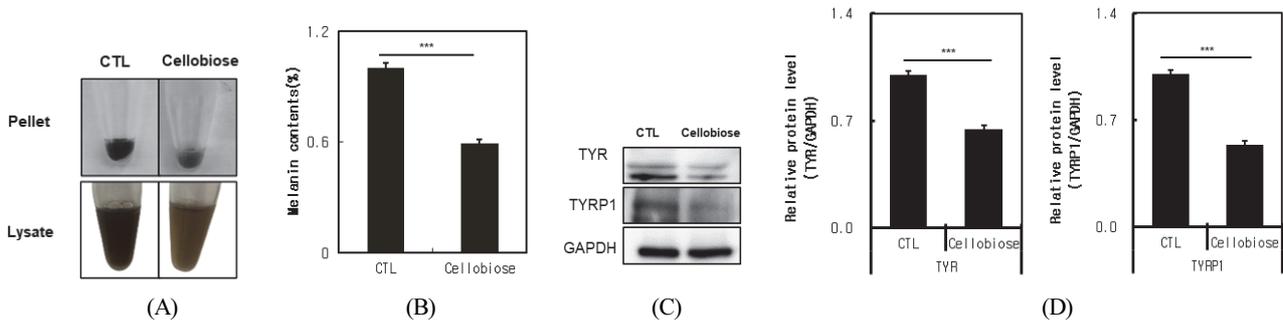


Figure 3. Cellulose reduced melanin production and downregulated the expression of melanogenesis-associated proteins in MNT-1 cells. (A) Optical comparison of the melanin contents of MNT-1 cells after treatment with 20 mg/mL of cellulose. (B) Quantification of the melanin contents relative to Figure 3A by melanin assay analysis. (C) Expression levels of melanogenesis-associated proteins TYR and TYRP1 in MNT-1 cells after treatment with 20 mg/mL of cellulose. (D) Comparison of TYR and TYRP1 protein expression levels relative to Figure 3C after quantification with Image J software. CTL, also known as control, was not treated with cellulose. The results are presented as the mean ± SD of the experiment (N = 3), **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.005, compared to control.

MNT-1 세포에 시간별로 처리하여 LC3의 발현량을 분석하였다. Cellulose을 처리하였을 때 농도와 시간의존적으로 LC3의 발현량 증가한 것을 확인하였다(Figure 2).

3.3. MNT-1 세포에서의 멜라닌 생성 억제 관찰

자가포식의 활성화는 인종에 따른 피부색을 조절하는데에 중요하다고 보고되어 있으며, 자가포식 활성화를 통해 멜라노솜 멜라닌 생성에 관여하는 인자인 TYR 및 TYRP1의 분해를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다 [20-21]. 세포 독성이 없는 20 mg/mL 농도의 Cellulose을 MNT-1 세포에 7 일간 처리 후, 48 h 간격으로 배지를 교체하였다. Melanin assay 실험을 통하여 멜라닌 감소량을 검토하였다. Cellulose을 대조군과 비교하였을 때, cellulose 처리군에서 육안적으로 상층액이 침전물에서 색상이 연한 색상으로 관찰하였고, melanin assay 실험 결과를 통해 멜라닌 함량이 감소함을 확인하였다. Cellulose을 MNT-1 세포에서 20 mg/mL 처리하여 TYR, TYRP1 western blot 실험을 통하여 발현량을 확인하였다. 대조군 비해 cellulose을 처리하였을 때, TYR, TYRP1의 발현량이 상대적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 cellulose가 미백 소재로서의 활용 가능성이 있음을 시사한다(Figure 3).

3.4. Cellulose 함유 화장품 안정도

Cellulose 함유 크림의 안정도를 4 °C, 25 °C, 37 °C, 50 °C, 4 주 동안 평가한 결과 4 °C, RT, 37 °C, 변색 및 층 분리 현상이 일어나지 않고 고온 50 °C 온도 조건에서 화장

Period	Moisturizing Cream (Containing Cellulose 2%)															
Immediately after manufacturing	4 °C				25 °C				37 °C				50 °C			
	pH 5.56				pH 5.56				pH 5.56				pH 5.57			
After 1 week	4 °C				25 °C				37 °C				50 °C			
	pH 5.41				pH 5.42				pH 5.42				pH 5.42			
After 1 day	4 °C				25 °C				37 °C				50 °C			
	pH 5.57				pH 5.57				pH 5.57				pH 5.56			
After 2 days	4 °C				25 °C				37 °C				50 °C			
	pH 5.59				pH 5.59				pH 5.58				pH 5.58			
After 3 days	4 °C				25 °C				37 °C				50 °C			
	pH 5.56				pH 5.55				pH 5.55				pH 5.56			
After 4 weeks	4 °C				25 °C				37 °C				50 °C			
	pH 5.63				pH 5.63				pH 5.62				pH 5.63			

Figure 4. Stability of a cosmetic cream formulation containing cellulose. The stability of creams formulated with 2% cellulose was tested by monitoring the pH and the visible features of the products over 4 weeks.

품의 열화 현상으로 3일후 층 분리 현상을 확인할 수 있었다. pH는 시간이 지남에 따라 변화가 없었다(Figure 4). 제형에 따른 함유량과 고온 50 °C 온도 조건에서의 제형을 고려한다면 다양한 제형의 항노화 화장품 소재로 응용할 수 있을 것으로 사료된다(Figure 4).

4. 결 론

올리고당은 식품, 의약품, 영양 및 화장품 산업에 응용분야에서 중요하게 작용되고 있다. 특히, cellobiose는 2개의 β -1-4 연결된 글루코스 단량체로 자연에 풍부한 화합물인 cellobiose의 산 가수분해에 의해 산업적 규모로 얻어지며, 생리적 기능이나 잠재적인 프리바이오틱 효과를 알려져 식품, 제약 등 다양한 분야에서 활용되고 있다[1-3, 22].

본 연구에서는 인간 멜라닌 세포 MNT-1 실험을 통해 셀로비오스의 세포독성 및 자가포식을 활성화 및 멜라닌 생성 감소량을 확인하였다. 피부의 자가포식 반응은 세포 내 에너지원이 고갈되거나 스트레스가 과도하게 발생하였을 때 활성화되어 에너지를 재생산하고 손상된 세포를 제거함으로써 노화방지, 멜라닌 생성 방지 기능이 있으며, 피부 세포의 건강한 상태를 향상 시키고 피부 질환을 예방할 수 있음이 최근 연구를 통해 증명되고 있다[7-11]. 또한 사람의 피부색을 결정하는 멜라닌은 자외선으로부터 유전자를 보호하고, 자유 라디칼(free radical)을 제거하여 세포 내에 중요한 역할을 하게 된다. 하지만 멜라닌을 분해하는 효소는 생체 내에 존재하지 않아, 멜라닌이 과도하게 생성될 경우 기미나 주근깨 같은 과색소침착증을 유발한다 [15-17, 20-21].

MNT-1 세포에서 cellobiose의 세포 독성 확인한 결과 40 mg/mL 이상에서 세포독성이 있음을 확인하여 이후 실험에는 20 mg/mL로 고정하여 실험하였다. 공초점 현미경으로 같은 당류인 글루코오스를 cellobiose과 동일한 양을 처리하였을 때, 자가포식 표지자로 알려진 LC3의 발현량이 cellobiose에서 자가포식 활성화로 인해 자가포식소체가 증가한 것을 확인하였다. 더불어 cellobiose를 농도별 시간별로 실험한 결과 LC3의 발현량 증가한 것을 확인하였다.

Cellobiose의 멜라닌 생성 변화를 검토한 결과 20 mg/mL 농도 적용시 대조군에 비교하여 멜라닌 생성량이 감소됨을 확인하였으며, western blot 실험을 통하여 멜라닌 생성 관련 인자인 TYR 및 TYRP1의 단백질 발현량이 상대적으로 감소하는 것을 확인하였다.

요약하면, 천연 이당류인 cellobiose는 자가포식을 활성화 시키고, 세포 내 멜라닌 생성을 억제하는 당 성분으로, 화장품 제형에 적용될 수 있음을 확인하였으며, 안정성과 잠재적인 미백 화장품소재로서 응용 가능성을 제시하고자 한다.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean government (MSIT) (No. 2019005607 to B. H. B. and NRF-2021R111A1A01053991 to B. M. K.), the Ajou University Research Fund (to B. H.B.), a grant provided by the Korea Initiative for fostering University of Research and Innovation Program of the National Research Foundation (NRF) funded by the Korean government (MSIT) (No. NRF2021MBH1A104892211; to B. H. B. and B. M. K.), the Gyeonggi Business & Science Accelerator (GBSA) grant and the project (to B. H. B and B. M. K) and a grant provided by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF 2021R1A6A1A10044950; to B. H. B and B. M. K).

References

1. T. Morita, M. Ozawa, H. Ito, S. Kimio, and S. Kiriya, Cellobiose is extensively digested in the small intestine by β -galactosidase in rats, *Nutrition*, **24**(11-12), 1199 (2008).
2. Y. Matsuura, Degradation of konjac glucomannan by enzymes in human feces and formation of short-chain fatty acids by intestinal anaerobic bacteria, *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), **44**(3), 423 (1988).
3. G. Zhang, L. Li, J. Liu, J. Cai, J. Fu, N. Li, H. Cao, H. Xu, Y. Zhang, and R. Cao, Comparing the metabolite components of Sichuan sun vinegar and other kinds of vinegar based on non-targeted metabolomic, *LWT*, **164**, 113640 (2022).
4. N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, **451**(7182), 1069 (2008).
5. L. Yu, C. K. Mcphee, L. Zheng, G. A. Mardones, Y. Rong, J. Peng, N. Mi, Y. Zhao, Z. Liu, F. Wan, D. W. Hailey, V. Oorschot, J. Klumperman, E. H. Baehrecke, and M. J. Lenardo, Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR, *Nature*,

- 465(7300), 942 (2010).
6. N. Mizushima and M. Komatsu, Autophagy renovation of cells and tissues, *Cell*, **147**(4), 728 (2011).
 7. B. Levine, N. Mizushima, and H. W. Virgin, Autophagy in immunity and inflammation, *Nature*, **469**(7330), 323 (2011).
 8. J. Lee, S. Giordanoa, and J. Zhang, Autophagy mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling, *Biochem J*, **441**(2), 523 (2012).
 9. L. Eckhart, E. Tschachler, and F. Gruber, Autophagic control of skin aging. *Front Cell Dev Biol*, **7**, 143(2019).
 10. X. Sui, R. Chen, Z. Wang, Z. Huang, N. Kong, M. Zhang, W. Han, F. Lou, J. Yang, Q. Zhang, X. Wang, C. He, and H. Pan, Autophagy and chemotherapy resistance a promising therapeutic target for cancer treatment, *Cell Death Dis*, **4**(10), e838 (2013).
 11. D. Murase, A. Hachiya, K. Takano, R. Hicks, M. O. Visscher, T. Kitahara, T. Hase, Y. Takema, and T. Yoshimori, Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes, *JID Innov*, **133**(10), 2416 (2013).
 12. I. Tanida, T. Ueno, and E. Kominami, LC3 and Autophagy, ed. V. Deretic, 445, 77, Humana Press, Totowa, New Jersey. (2008).
 13. G. Runwal, E. Stamatakou, FH. Siddiqi, C. Puri, Y Zhu, and D. C. Rubinsztein, LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells, *Sci. Rep*, **9**(1), 1(2019).
 14. J. Martinez, J. Almendinger, A. Oberst, R. Ness, C. P. Dillon, P. Fitzgerald, M. O. Hengartner, and D. R. Green, Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells, *PNAS Nexus*, **108**(42), 17396 (2011).
 15. D. Murase, A. Hachiya, K. Takano, R. Hicks, V. O. Marty, K. Takashi, H. Tadashi, T. yoshinori, and Y. Tamotsu, Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes, *J. Invest. Dermatol*, **133**(10), 2416(2013)
 16. H. Ho and A. K. Ganesan, The pleiotropic roles of autophagy regulators in melanogenesis, *Pigment Cell Melanoma Res*, **24**(4), 595 (2011).
 17. J. Y. Kim, E. J. Lee, Y. Ahn, S Park, Y. J. Bae, T. G. Kim, and S. H. Oh, Cathepsin L, a Target of hypoxia-inducible factor-1- α , is involved in melanosome degradation in melanocytes, *Int J Mol Sci*, **22**(16), 8596 (2021).
 18. S. Y. Jung, H. J. Yoo, H. J. Heo, S. M. Lee, B. Sofia, B. S. Cha, Lei Lei, S. H. Lee, B. H. Bin, M. G. Lee, and B. M. Kawk, Autophagy Activation by 2'-Fucosyllactose Reduces Melanin Production, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **48**(2), 105 (2022).
 19. S. M. De Leeuw, N. P. Smit, M. Van Veldhoven, E. M. Pennings, S. Pavel, J. W. Simons, and A. Schothorst, Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J Photochem Photobiol B*, **61**(3), 106 (2001).
 20. J. Y. Kim, J. Kim, Y. Ahn, E. J. Lee, S. Hwang, A. Abdurrahman, K. Park, H. J. Chung, H. J. Kim, S. H. Lee, M. S. Lee, and S. H. Oh, Autophagy induction can regulate skin pigmentation by causing melanosome degradation in keratinocytes and melanocyte, *Pigment Cell Melanoma Res*, **33**(3), 403(2020).
 21. Korea. Patent 10-2018-0118033 (2021).
 22. P. F. Ávila, M. F. Silva, M. Martins, and R. Goldbeck, Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications, *J. Microbiol. Biotechnol*, **37**(5), 1(2021).